epi pro colon

Kit de préparation pour extraction d'ADN de plasma

CE IVD

Notice d´utilisation

Avant d'utiliser ce kit, veuillez lire attentivement la notice et suivre précisement les instructions afin de garantir la fiabilité et la pertinence des résultats des tests.

---

IFU 0002FR, rév 6, tous droits réservés ©, mars 2011, Epigenomics AG

REF M5-01-001

Σ 24

Epigenomics AG,
10178 Berlin, Alemagne

epigenomics

## Contenu

1. Informations importantes 3
2. Usage prévu 4
3. Description du test 4
4. Principes technologiques fondamentaux 4
5. Réactifs 5
6. Instruments, consommables et réactifs nécessaires, mais non fournis 5
7. Précautions 7
8. Stockage et stabilité des réactifs 8
9. Réactifs du test et leur préparation avant utilisation 8
9.1. Préparation des réactifs du test 8
9.1.1. Préparation de la solution Epi *pro*Colon Proteinase 8
9.1.2. Préparation de la solution Epi *pro*Colon Carrier 9
9.1.3. Préparation de la solution Epi *pro*Colon Bis Reagent A 9
9.2. Prise de sang 9
9.3. Préparation du plasma 9
10. Protocole expérimental 10
10.1. Lyse et extraction 10
10.1.1. Décongélation des échantillons de plasma 10
10.1.2. Lyse 10
10.1.3. Liaison de l'ADN 10
10.1.4. Lavage de l'ADN 10
10.1.5. Elution 11
10.1.6. Stockage de l'ADN extrait 11
10.2. Conversion au bisulfite 11
10.2.1. Purification de l'ADN bisulfité 12
10.2.2. Phase de liaison chimique 12
10.2.3. Premier lavage 13
10.2.4. Deuxième lavage 13
10.2.5. Troisième lavage 13
10.2.6. Séchage 14
10.2.7. Élution 14
10.2.8. Stockage de l'ADN traité au bisulfite 14
11. Contrôle Qualité 14
12. Limites du procédé 15
13. Caractéristiques techniques 15
14. Références 15
15. Pour nous contacter 16

## 1. Informations importantes

**Important:** *avant* d'utiliser le *Kit de préparation pour extraction d'ADN de plasma Epi proColon,* les utilisateurs doivent se familiariser avec les composants du kit et lire attentivement les instructions.

Signification des symboles utilisés:

| | |
|---|---|
| | Veuillez suivre les instructions |
| | Référence du Kit |
| | Destiné aux examens diagnostiques *in-vitro* |
| | Numéro de lot |
| | Date de péremption |
| | Fabricant |
| | Température de stockage |
| | Nombre de tests |
| | A conserver dans l'obscurité / protéger du soleil |

## 2. Usage prévu

Le Kit de préparation pour extraction d'ADN de plasma Epi *pro*Colon comprend des réactifs servant à la préparation d´ADN provenant de plasma EDTA humain, converti par un traitement au bisulfite, et analysé par PCR en temps réel à des fins de diagnostic *in-vitro*. Les réactifs du Kit de préparation pour extraction d'ADN de plasma Epi *pro*Colon permettent l'extraction de l'ADN, la conversion de l'ADN par le bisulfite et la purification de ce même ADN bisulfité.

Le Kit de préparation pour extraction d'ADN de plasma Epi *pro*Colon a été validé pour une utilisation avec le Kit de PCR en temps réel Epi *pro*Colon (M5-01-002).

## 3. Description du test

Le Kit de préparation pour extraction d'ADN de plasma Epi proColon est utilisé pour l'extraction d´ADN à partir de 3,5 ml de plasma et pour convertir ensuite cet ADN purifié au moyen de bisulfite. Après un dernier lavage, l'ADN est prêt à être utilisé pour l'analyse du pattern de méthylation par PCR en temps réel.

Le principe de détection de l'ADN méthylé comprend trois grandes étapes; tout d'abord, un échantillon de plasma est recueilli à partir de sang total en utilisant les méthodes standards. La méthylation de l'ADN se produit principalement au niveau de dinucléotides CpG, un nucléotide de cytosine suivi par un nucléotide de guanine. L'ADN plasmatique est extrait en isolant les acides nucléiques au moyen de particules magnétiques. L'ADN ainsi extrait est ensuite chimiquement modifié au moyen de bisulfite de sodium, afin de détecter la méthylation de l'ADN. Au cours de ce traitement chimique, la cytosine non méthylée d'un dinucléotide CpG est transformée en uracile, alors que la cytosine méthylée reste inchangée. Ceci conduit à une substitution spécifique de chaque cytosine non méthylée. Les bloqueurs et les sondes utilisés lors d'une PCR ultérieure reconnaissent ces modifications de base et font la distinction entre les séquences méthylées et non-méthylées.

## 4. Principes technologiques fondamentaux

L'extraction de l'ADN génomique du plasma d'un patient consiste à lier l'ADN génomique circulant à des petites particules magnétiques qui seront ensuite séparées du plasma à l'aide d'un aimant. Pour éliminer les impuretés restantes sur les particules magnétiques, plusieurs lavages seront effectués. Durant la phase d'élution, l'ADN purifié sera séparé des particules magnétiques par l´utilistion d´un tampon d´élution.

L'ADN génomique élué est ensuite traité au bisulfite. Lors de ce traitement chimique, les cytosines non méthylées de l'ADN seront modifiées de manière spécifique. Le traitement au bisulfite de l´ADN est la méthode de référence pour analyser l´ADN méthylé. Etant donné que la séquence de l'ADN est préservée, cette méthode permet d'effectuer diverses applications pour analyser cette matrice. La transformation est basée sur l'addition nucléophile d'un ion bisulfite à une cytosine et sur la réaction de désamination résultante, lors de laquelle se forme du sulfonate d'uracile, tandis que la cytosine méthylée – la 5-méthyl-cytosine – n'est pas désaminée et reste donc identique. Une transformation totale de la cytosine non méthylée ainsi qu'un faible taux de dégradation de l'ADN après le traitement sont des paramètres essentiels pour permettre une mesure sensible de la méthylation de l'ADN. Une dénaturation incomplète avant traitement ainsi que des conditions chimiques trop rigoureuses durant la réaction ont été identifiées comme les principales sources d'erreurs de cette méthode.

Les différentes étapes du protocole maintiennent l'ADN sous forme simple brin et réunissent les conditions chimiques idéales afin de permettre une conversion complète par le bisulfite, un rendement d'ADN important et une faible dégradation de l'ADN modifié. Après purification de l'ADN par liaison aux particules magnétiques et élimination des impuretés résiduelles par lavage, l'ADN est prêt à être utilisé pour les analyses ultérieures.

## 5. Réactifs

Le kit contient des réactifs permettant 24 préparations d'ADN plasmatique:

| Composants | Récipients | Volumes |
|---|---|---|
| Epi *pro*Colon Extraction 1 | 1 bouteille | 90 ml |
| Epi *pro*Colon Extraction 2 | 2 bouteilles | chacune 130 ml |
| Epi *pro*Colon Extraction 3 | 1 bouteille | 39 ml |
| Epi *pro*Colon Extraction 4 | 2 tubes | chacun 1300 µl |
| Epi *pro*Colon Magnetic Beads | 2 tubes | 1100 µl |
| Epi *pro*Colon Carrier | 1 tube | -- |
| Epi *pro*Colon Carrier Diluent | 1 tube | 210 µl |
| Epi *pro*Colon Proteinase | 1 tube | -- |
| Epi *pro*Colon Bis Reagent A | 3 tubes | -- |
| Epi *pro*Colon Bis Reagent B | 1 tube | 860 µl |
| Epi *pro*Colon Purification 1 | 1 bouteille | 39 ml |
| Epi *pro*Colon Purification 2 | 1 bouteille | 16 ml |
| Epi *pro*Colon Purification 3 | 1 bouteille | 8 ml |
| Epi *pro*Colon Purification 4 | 1 tube | 1,6 ml |

## 6. Instruments, consommables et réactifs nécessaires, mais non fournis

- Tubes Vacutainer® EDTA (Becton Dickinson, N° de référence. 367525).
- S-Monovette® Hématologie, $K_3$EDTA 9,0 ml (Sarstedt, N° de référence catalogue: 02.1066.001)
- S-Monovette® 8,5 ml CPDA (Sarstedt, N° de référence catalogue: 01.1610.001)
- Eau pour la biologie moléculaire.
- Tubes à centrifuger de 50 ml en polypropylène à base conique (par ex. Sarstedt, N° de référence 62.547.254), ou équivalent.
- Tubes à réaction Safe-Lock - 0,5 ml (par ex. Eppendorf AG, N° de référence 0030 121.023), ou équivalent.

- Tubes à réaction Safe-Lock - 1,5 ml (par ex. Eppendorf AG, N° de référence 0030 120.086), ou équivalent.
- Tubes à réaction Safe-Lock - 2 ml (par ex. Eppendorf AG, N° de référence 0030 120.094), ou équivalent.
- Pointes à filtre pour pipettes (par ex. VWR International GmbH 612-1430, KOEHK-0518, 613-2658), ou équivalent.
- Portoir pour tubes à centrifuger de 50 ml et pour tubes à centrifuger de 2 ml (VWR International GmbH, 50 ml - N° de référence 211-0200; 2 ml - N° de référence 211-0213), ou équivalent.
- Gants à usage unique.
- Séparateur magnétique: chemagic Stand 50 k - type B (Chemagen, N° de référence 303).
- Séparateur magnétique: chemagic Stand 2 x 12 (Chemagen, N° de référence 300).
- Agitateur SB 2 (Carl Roth GmbH Y549.1) avec plaque de rotation (Carl Roth, GmbH Y553.1), ou équivalent.
- Bain-marie (Gesellschaft für Labortechnik GmbH GFL, Type 1002, N° de référence 163-9905902), ou équivalent.
- Vortex (VWR International GmbH, N° de référence 444-1372), ou équivalent.
- Thermomixer comfort (N° de référence 5355 000.011) avec bloc chauffant pour séchage pour tube à réaction 2 ml (Eppendorf AG, N° de référence 5362 000.019), ou équivalent.
- Portoir flottant Rotilabo® pour tubes à centrifuger de 50 ml (Carl Roth GmbH, N° de référence P201.1), ou équivalent.
- Jeu de pipettes Eppendorf Référence, 0,1-2,5 µl, 0,5-10 µl, 10-100 µl, 100-1000 µl (Eppendorf AG), ou équivalent.
- Pipette Pasteur à usage unique de 2,3 ml (Carl Roth GmbH, N° de référence EA56.1), ou équivalent.
- Pipette Pasteur à usage unique 6 ml (VWR International GmbH, N° de référence 612-4464), ou équivalent.
- Multipette Plus (Eppendorf AG, N° de référence 4981 000.019), ou équivalent.
- Mastercycler (Eppendorf AG, N° de référence 5331 000.018) avec bloc chauffant pour Tubes à réaction de 0,5 ml, ou équivalent.
- Centrifugeuse 5417 R (Eppendorf AG, N° de référence 5407 000.317), ou équivalent.
- Kit de contrôle de procédure Epi *pro*Colon (M5-01-003).

## 7. Précautions

Toujours porter une blouse de laboratoire et des gants à usage unique. Pour le lavage des surfaces contaminées, utiliser de l'eau.

| | |
|---|---|
| **Epi *pro*Colon Extraction 1:** contient de l'isothiocyanate de guanidine; R20/21/22-32-52/53, S13-36/37, S61* | |
| **Epi *pro*Colon Extraction 2:** contient du sesquioléate de sorbitan, du perchlorate de sodium et de l'éthanol; R9-11-22; S13, S16* | |
| **Epi *pro*Colon Extraction 3:** contient du sesquioléate de sorbitan, du perchlorate de sodium et de l'éthanol; R9-11-22; S13,-16* | |
| **Epi *pro*Colon Purification 1:** contient du sesquioléate de sorbitan, du perchlorate de sodium et de l'éthanol; R9-11-22 ; S7-16* | |
| **Epi *pro*Colon Purification 2:** contient de l'éthanol; R11, S7-16* | |
| **Epi *pro*Colon Purification 3:** contient de l'éthanol; R11, S7-16* | |
| **Epi *pro*Colon Proteinase:** R36/37/38-42/43, S22-24/25-37-45* | |
| **Epi *pro*Colon Carrier Diluant:** contient de l'isothiocyanate de guanidine; R20/21/22-32-52/53, S13-36/37-61* | |
| **Epi *pro*Colon Bis Reagent A:** contient du sulfite de sodium et du bisulfite de sodium; R22-31-41 ; S26-39* | |
| **Epi *pro*Colon Bis Reagent B:** contient du trolox, de l'alcool tétrahydrofurfurylique: R36*, S39* | |

Epi *pro*Colon Extraction 4, Epi *pro*Colon Purification 4, Epi *pro*Colon Magnetic Beads et Epi *pro*Colon Carrier ne contiennent aucune substance dangereuse pour la santé.

***(Phrases de risque) R-Explications**

R 9: Peut exploser si mélangé avec des matières combustibles. R 10: Inflammable. R 11: Facilement inflammable. R 20/21/22: Nocif par inhalation, par contact avec la peau et en cas d'ingestion. R22 Toxique en cas d'ingestion. R 31: Au contact d'un acide, dégage un gaz toxique. R 32: Au contact d'un acide, dégage un gaz très toxique. R 36: Irritant pour les yeux. R 36/37/38: irritant pour les yeux, les voies respiratoires et la peau. R 41: risques de lésions oculaires graves. R 42/43: Peut entraîner une sensibilisation par inhalation et par contact avec la peau. R 52/53: Nocif pour les organismes aquatiques ; Peut entraîner des effets néfastes à long terme pour l'environnement aquatique.

***S-Explications (Phrases de sécurité)**

S 7: Conserver le récipient soigneusement fermé. S 13: Conserver à l'écart des aliments et boissons, y compris ceux pour animaux. S 16: Conserver à l'écart de toute flamme ou source d'étincelles. Ne pas fumer. S 22: Ne pas respirer les poussières. S 24/25: Éviter le contact avec la peau et les yeux. S 26: En cas de contact avec les yeux, laver immédiatement à l'eau courante et consulter un ophtalmologiste. S 36/37: Porter un vêtement de protection et des gants appropriés. S 37: Porter des gants appropriés. S 39: Porter un appareil de protection des yeux/du visage approprié. S 45: En cas d'accident ou de malaise, appeler directement le médecin (si possible, montrer cette étiquette). S 61: Éviter tout rejet dans l'environnement. Avant emploi, se référer aux instructions spécifiques et consulter les fiches de données de sécurité.

## 8. Stockage et stabilité des réactifs

Entreposer tous les réactifs du *Kit de préparation pour extraction d'ADN de plasma Epi proColon* dans l'obscurité à une température ambiante située entre 18 et 25 °C.

En cas d'entreposage plus long, (jusqu'à 3 mois), conserver le Carrier dissous, la Proteinase, ainsi que le Bis Reagent A sous forme d'aliquots à une température comprise entre -15 et -25 °C. Eviter d'alterner les cycles de congélation et de décongélation.

Le *Kit de préparation pour extraction d'ADN de plasma Epi proColon* reste stable jusqu'à la date de péremption indiquée, à condition qu'il soit entreposé et manipulé conformément aux indications. Ne pas utiliser les consommables au-delà de cette date. Ne pas mélanger les composants provenant de Kit de différents lots.

**Remarque:** au cas où l'Epi *pro*Colon Extraction 1 contient des précipités, procédez de la manière suivante:

- Faire chauffer l'Epi *pro*Colon Extraction 1 dans un bain-marie à 50 ± 5 °C pendant 10 min et agiter doucement.
- Répéter l´étape précédente et agiter à nouveau jusqu'à ce que le précipité soit complètement dissous.
- L'Epi *pro*Colon Extraction 1 doit être revenu à température ambiante avant de pouvoir être utilisé (entre 18 et 25 °C).

La couleur brune de la solution Bis Reagent Epi *pro*Colon est normale et n'affecte en rien son efficacité.

## 9. Réactifs du test et leur préparation avant utilisation

### 9.1. Préparation des réactifs du test

#### 9.1.1. Préparation de la solution Epi *pro*Colon Proteinase

1. Ajouter 860 µl d'eau pour la biologie moléculaire dans le tube contenant l´ Epi *pro*Colon Proteinase.
2. Mélanger vigoureusement pendant 1 minute à l´aide du vortex.

3. Mélanger sur le vortex jusqu'à ce que tout le réactif soit dissous.

#### 9.1.2. Préparation de la solution Epi *pro*Colon Carrier

1. Ajouter 205 µl d´Epi *pro*Colon Carrier Diluent dans le tube contenant l'Epi *pro*Colon Carrier
2. Mélanger vigoureusement à l'aide du vortex pendant au moins 2 minutes.

#### 9.1.3. Préparation de la solution Epi *pro*Colon Bis Reagent A

1. Ajouter 800 µl d'eau dans le tube contenant l'Epi *pro*Colon Bis Reagent A.
2. Mélanger vigoureusement à l'aide du vortex jusqu'à ce que le réactif soit partiellement dissous.
3. Ajouter de nouveau 800 µl d'eau.
4. Mélanger vigoureusement pendant 3 min à l´aide du vortex.
5. Mélanger jusqu'à ce que tout le réactif soit dissous.

**Remarque:** le réactif Epi *pro*Colon Bis Reagent A n'est pas très soluble. Il peut donc être chauffé doucement (45 à 55 °C).

### 9.2. Prise de sang

Pour effectuer la prise de sang, utiliser les tubes Vacutainer EDTA, S-Monovette® Hématologie, 9,0 ml $K_3$EDTA ou S-Monovette® 8,5 ml CPDA. Ne pas congeler les échantillons de sang. La préparation du plasma peut être réalisée jusqu'à 24 heures après la prise de sang si l'échantillon sanguin a été conservé de façon continue à une température comprise entre 2 et 8 °C.

Si les tubes S-Monovette® 8,5 ml CPDA sont utlisés, les échantillons de sang peuvent être conservé jusqu´à 48 heures à une température comprise entre 2 et 25 °C.

### 9.3. Préparation du plasma

1. Enlever le frein de la centrifugeuse pour éviter la rupture des couches cellulaires.
2. Centrifuger le sang dans les tubes Vacutainer ou S-Monovette à 1350 ± 150 g pendant 12 min. Au cas où la centrifugeuse indiquerait la vitesse de rotation en tour par minute (tr/min), la valeur correspondante en g doit être vérifiée dans le tableau de conversion situé dans le mode d'emploi de la centrifugeuse fourni par le fabricant.
3. Retirer le tube de la centrifugeuse. Tout échantillon fortement hémolytique (plasma de couleur rouge brillant) ne doit pas être utilisé. Dans ce cas, il faut refaire une nouvelle prise de sang.
4. Utiliser une pipette Pasteur à usage unique pour transférer le plasma du tube de prélèvement dans un tube à centrifuger de 15 ml.
5. Centrifuger le plasma dans le tube à centrifuger de 15 ml pendant 12 min à 1350 ± 150 g.
6. Au moyen d'une nouvelle pipette Pasteur à usage unique, transférer 3,5 ml de plasma du tube à centrifuger de 15 ml dans un tube à centrifuger en polypropylène de 50 ml à base conique.
7. A la fin de cette procédure, commencez l'extraction de l'ADN avec le kit de préparation pour extraction d'ADN de plasma Epi *pro*Colon. Le plasma peut être conservé jusqu'à 18 heures à une température comprise entre 2 et 8 °C, ou jusqu'à 7 jours à une température comprise entre -15 et -25 °C.

## 10. Protocole expérimental

### 10.1. Lyse et extraction

#### 10.1.1. Décongélation des échantillons de plasma (uniquement en cas d'utilisation d´échantillons préalablement congelés)

Laisser revenir le plasma congelé à température ambiante pendant 30 min.

#### 10.1.2. Lyse

1. Ajouter dans un tube de 50 ml les éléments suivants:
   - 3,5 ml de plasma sanguin ou d'Epi *pro*Colon Positive Control, ou d´Epi *pro*Colon Negative Control
   - 3,5 ml d'Epi *pro*Colon Extraction 1
   - 5 µl de la solution d'Epi *pro*Colon Carrier
   - 20 µl de la solution d'Epi *pro*Colon Proteinase
   - Le volume total est d´environ 7 ml

   **Remarque:** Agiter brièvement le tube de solution Epi *pro*Colon Extraction 1 avant utilisation pour vérifier la présence de précipités. En présence de précipités, suivre les instructions de la « Remarque » de la Section 8.
2. Mélanger le tube à l´aide du vortex pendant 10 secondes et mettre le tube pendant 10 min au bain-marie à une température de 56 ± 2 °C.

#### 10.1.3. Liaison de l'ADN

1. Sortir les tubes de 50 ml du bain-marie et ajouter les éléments suivants dans l'ordre indiqué:
   - 70 µl d'Epi *pro*Colon Magnetic Beads (resuspendu juste avant en mélangeant pendant 30 secondes au vortex)
   - 10 ml d'Epi *pro*Colon Extraction 2
2. Mélanger vigoureusement pendant 10 secondes au vortex.
3. Incuber à température ambiante les tubes de 50 ml en homogénéisant au moyen d'un agitateur rotatif pendant 60 ± 5 min.

   **Remarque:** Une suspension homogène de billes dans la suspension Epi *pro*Colon Magnetic Beads est indispensable pour une performance optimale. Toute variation de la quantité de billes spécifiée peut donner lieu à des résultats erronés.

#### 10.1.4. Lavage de l'ADN

1. Placer les tubes de 50 ml dans le portoir magnétique et attendre 5 min pour permettre aux particules magnétiques de former un culot.
2. Eliminer le surnageant. Assurez-vous que le surnageant soit complétement enlevé.
3. Ajouter 1,5 ml d'Epi *pro*Colon Extraction 3 et mélanger vigoureusement pendant 10 secondes au vortex. Veiller à ce que les particules magnétiques soient à nouveau complétement en suspension.

4. Transférer la suspension avec les particules magnétiques dans un tube Safe-Lock de 2,0 ml avec une pipette Pasteur à usage unique. Centrifuger légèrement les tubes de 2 ml afin de faire tomber les gouttelettes du couvercle du tube.
5. Placer les tubes dans un portoir magnétique. Attendre 2 min pour permettre aux particules magnétiques de former un culot.
6. A l'aide d'une pipette, éliminer autant que possible le surnageant. Prendre soin de ne pas enlever des particules magnétiques.
7. Centrifuger pendant 10 secondes à 1000 ± 150 g.
8. Placer les tubes dans un portoir magnétique. Attendre 2 min pour permettre aux particules magnétiques de former un culot et éliminer les résidus de solution de lavage.

#### 10.1.5. Elution

1. Transférer les tubes dans un portoir *non* magnétique.
2. Ajouter 100 µl d'Epi *pro*Colon Extraction 4 dans chacun des tubes et mélanger vigoureusement à l'aide du vortex jusqu'à ce que toutes les particules magnétiques soient complètement en suspension.
3. Placer les tubes dans un thermomixer et incuber pendant 15 min à une température de 65 ± 2 °C tout en agitant (1400 tr/m).
4. Centifuger légèrement les tubes afin de faire tomber les gouttelettes du couvercle.
5. Placer les tubes dans un portoir magnétique. Attendre 2 min pour permettre aux particules magnétiques de former un culot. Au cas où des particules magnétiques se trouveraient encore dans le surnageant, prolonger le temps d´attente.
6. Transférer tout le surnageant dans un tube Safe-Lock PCR de 0,5 ml.
7. Le volume d'élution est d'environ ~100 µl.

#### 10.1.6. Stockage de l'ADN extrait

L'ADN ainsi extrait peut être conservé à une température comprise entre 2 et 8 °C pendant un maximum de 24 heures ou jusqu´à 3 jours à une température comprise entre -15 et -25°C

### 10.2. Conversion au bisulfite

**Remarque:** Ajouter toujours les réactifs dans l'ordre donné !

Ne jamais mélanger la solution Epi *pro*Colon Bis Reagent A avec la solution Epi *pro*Colon Bis Reagent B avant que celles-ci ne soient ajoutées à l'ADN.

Ne pas mettre les solutions Epi *pro*Colon Bis Reagent dissoutes dans la glace.

Ne pas transférer de billes magnétiques dans la réaction de bisulfite.

Préparer la réaction chimique au bisulfite dans un tube Safe-Lock Eppendorf à PCR de 0,5 ml. Ajouter les composants suivants à l´ADN extrait en respectant l'ordre donné:

1. Ajouter 190 µl de la solution d'Epi *pro*Colon Bisulfite Reagent A.
2. Ajouter 30 µl de la solution d'Epi *pro*Colon Bisulfite Reagent B.

**Remarque:** Le volume total est d'environ 320 µl.

3. Fermer les tubes à PCR de 0,5 ml et bien mélanger à l'aide du vortex pendant 20 secondes. Les tubes à PCR de 0,5ml sont ensuite brièvement centrifugés afin de faire tomber les gouttelettes du couvercle.
4. Placer les tubes à PCR sur la plaque chauffante du Mastercycler dans les gands puits
5. Programmer le Mastercycler conformément au tableau 1.

**Remarque:** Afin d'éviter une évaporation des réactifs, il est important de faire chauffer le couvercle du Mastercycler à 105 °C pendant l'ensemble du programme du thermocycleur.

L'ADN modifié peut rester dans le Mastercycler durant la nuit sans pertes d´efficacité. Ne pas congeler le contenu des tubes à PCR!

Tableau 1: Programme du thermocycleur pour la conversion au bisulfite

| Étape n° | Étape | Temps | Température |
|---|---|---|---|
| 1 | Dénaturation initiale | 5 min | 96 °C |
| 2 | Incubation | 25 min | 50 °C |
| 3 | Dénaturation | 5 min | 96 °C |
| 4 | Incubation | 85 min (1h 25 min) | 50 °C |
| 5 | Dénaturation | 5 min | 96 °C |
| 6 | Incubation | 295 min (4h 55 min) | 50 °C |
| 7 | Conservation | < 14 h | 20 °C |

### 10.2.1. Purification de l'ADN bisulfité

Préparer les tubes suivants pour chaque échantillon:

- Un tube Safe-Lock PCR de 2 ml par échantillon pour les différents lavages.
- Un tube Safe-Lock PCR de 1,5 ml par échantillon pour l'élution.

### 10.2.2. Phase de liaison chimique

**Remarque:** Le rendement de l'ADN, obtenu après le lavage, dépend en très grande partie de la quantité adéquate de particules magnétiques ajoutée aux réactifs de départ.

Mélanger vigoureusement à l'aide du vortex pendant 30 secondes pour resuspendre les particules magnétiques Epi *pro*Colon.

Répéter cette dernière étape (resuspension des particules magnétiques Epi *pro*Colon) après chaque sixième échantillon, afin de garantir la présence d'un nombre identique de particules magnétiques dans chaque ADN extrait.

1. Mélanger vigoureusement au vortex pendant 10 secondes les tubes Safe-Lock PCR de 0,5 ml contenant la réaction au bisulfite.
2. Centrifuger brièvement les tubes afin de faire tomber les gouttelettes du couvercle.
3. Transférer l'ensemble de la réaction de départ dans un tube Safe-Lock PCR de 2,0 ml.
4. Ajouter 1 µl de solution Epi *pro*Colon Carrier.
5. Ajouter 1,5 ml d'Epi *pro*Colon Purification 1.

**Remarque:** La solution Epi *pro*Colon Carrier peut être, avant son utilisation, mélangée avec de l'Epi *pro*Colon Purification 1 pour permettre de manipuler de plus grands volumes. Ce mélange peut être conservé jusqu'à 12 h à température ambiante.

6. Ajouter avec précaution 10 µl de particules magnétiques Epi *pro*Colon resuspendues.

**Remarque:** Une suspension homogène des billes dans la suspension Epi *pro*Colon Magnetic Beads est indispensable pour une performance optimale. Toute variation de la quantité de billes spécifiée peut donner lieu à des résultats erronés.

7. Fermer le couvercle du tube et mélanger pendant 10 secondes vigoureusement à l´aide du vortex.
8. Mettre les tubes dans un thermomixer et laisser incuber pendant 60 min à température ambiante tout en agitant (1400 tr/m).
9. Enlever les tubes du thermomixer et régler la température du thermomixer sur 55 °C.
10. Centrifuger brièvement les tubes afin de faire tomber les gouttelettes du couvercle.
11. Placer les tubes dans un portoir magnétique et attendre 2 min jusqu'à ce que les particules magnétiques aient formé un culot.
12. A l'aide d'une nouvelle pipette, prélever autant de surnageant que possible.

#### 10.2.3. Premier lavage

1. Retirer les tubes de 2 ml du portoir magnétique et les placer dans un portoir non magnétique.
2. Ajouter 300 µl d'Epi *pro*Colon Purification 2.
3. Fermer le couvercle du tube et mélanger brièvement au vortex, afin de resuspendre les particules magnétiques.
4. Centrifuger brièvement les tubes afin de faire tomber les gouttelettes du couvercle.
5. Placer les tubes dans un portoir magnétique et attendre 2 min jusqu'à ce que les particules magnétiques aient formé un culot.
6. Enlever tout le surnageant à l'aide d'une pipette.

#### 10.2.4. Deuxième lavage

Répéter les étapes 1 à 6 décrites dans le paragraphe **10.2.3**

#### 10.2.5. Troisième lavage

1. Enlever les tubes de 2 ml du portoir magnétique et les placer dans un portoir non magnétique.
2. Ajouter 300 µl d'Epi *pro*Colon Purification 3.
3. Fermer le couvercle du tube et mélanger brièvement à l´aide du vortex afin de resuspendre les particules magnétiques.
4. Centrifuger brièvement les tubes afin de faire tomber les gouttelettes du couvercle.
5. Placer les tubes dans un portoir magnétique et attendre 2 min jusqu'à ce que les particules magnétiques aient formé un culot.
6. Enlever tout le surnageant au moyen d'une pipette.
7. Centrifuger les tubes à 1.000 ± 150 g pendant 30 secondes pour faire tomber les gouttelettes du couvercle.

8. Placer les tubes dans un portoir magnétique et attendre 2 min jusqu'à ce que les particules magnétiques aient formé un culot.
9. Enlever le reste du surnageant à l'aide d'une pipette.

#### 10.2.6. Séchage

1. Placer les tubes – couvercles ouverts - dans le thermomixer préchauffé à 55 ± 2 °C et laisser incuber à cette température pendant 5 min.

   **Attention: Ne pas laisser sécher trop longtemps ! Un temps d'incubation plus long peut provoquer une perte de rendement de l'ADN obtenu.**

2. Enlever les tubes de 2 ml du thermomixer et les placer dans un portoir non magnétique.

#### 10.2.7. Élution

1. Ajouter 55 µl d'Epi *pro*Colon Purification 4 et mélanger brièvement sur le vortex afin d'obtenir une resuspension des particules magnétiques.
2. Placer les tubes dans le thermomixer et laisser incuber à 55 ± 2 °C tout en agitant (1400 tr/m) pendant 15 min.
3. Centrifuger brièvement les tubes afin de faire tomber les gouttelettes du couvercle.
4. Placer les tubes dans un portoir magnétique et attendre 2 min jusqu'à ce que les particules magnétiques aient formé un culot. Au cas où des particules magnétiques se trouveraient encore dans le surnageant, prolonger le temps d´attente.
5. Transférer l'ensemble de l'éluat dans une plaque multi-puits. Alternativement, on pourra utiliser une rangée de 8 tubes ou des tubes à réactions pour PCR ou encore des tubes Safe-Lock de 1,5ml.

#### 10.2.8. Stockage de l'ADN traité au bisulfite

Lorsque l'ADN extrait et traité au bisulfite n'est pas utilisé immédiatement, il peut être conservé jusqu´à 3 jours à une température comprise entre –15 et –25 °C ou à une température comprise entre 2 et 8 °C pendant un maximum de 24 heures.

## 11. Contrôle Qualité

Le kit de contrôle de procédure Epi *pro*Colon (M5-01-003) comprend des contrôles Epi *pro*Colon Positive et Negative Control. Ces contrôles doivent être éffectués lors de chaque test afin de controler le bon déroulement du processus et de garantir la validité des résultats. Les valeurs obtenues pour le test de contrôle Epi *pro*Colon Positive/Négative Control doivent être dans les limites de validité spécifiées dans la Notice d'utilisation du kit de PCR en temps réel Epi *pro*Colon (M5-01-002). Si un des contrôles se situe en dehors des limites de validité, les résultats du test afférent ne sont pas validés et ne peuvent pas être pris en compte. Tous les patients concernés par ce test devront être testés une nouvelle fois.

Si les procédures de Contrôle – Qualité au sein de votre laboratoire exigent des vérifications plus fréquentes, respectez ces instructions.

## 12. Limites du procédé

- Ce produit est validé pour une utilisation avec du plasma EDTA humain. Toute utilisation de ce produit avec d'autres échantillons biologiques n'est ni validée, ni conseillée.
- Ce produit est validé pour une utilisation avec le kit de PCR en temps réel Epi *pro*Colon (M5-01-002). D'autres applications n´ont pas été démontré.
- Afin d'éviter toute contamination entre les échantillons des patients, nous vous conseillons d'utiliser des pipettes à usage unique et/ou des pointes de pipettes à usage unique.
- Les échantillons hémolysés ne peuvent pas être utilisés car l´effet de l´hémolyse sur le test est inconnu.

## 13. Caractéristiques techniques

Le Kit de préparation pour extraction d'ADN de plasma Epi *pro*Colon a été testé en combinaison avec le kit de PCR en temps réel Epi *pro*Colon (M5-01-002), avec des réactifs de contrôle provenant du kit de contrôle de procédure Epi *pro*Colon (M5-01-003), avec des échantillons techniques constitués d'ADN tamponné, avec des mélanges de plasma EDTA humain et avec des échantillons de plasma individuels. Le Kit de préparation pour extraction d'ADN de plasma Epi *pro*Colon permet d´obtenir de l'ADN converti par bisulfite, qui dans plus de 99 % des cas, convient à l'analyse par PCR en temps réel.

La performance du Kit de préparation pour extraction d'ADN de plasma Epi *pro*Colon a été établie en combinaison avec le kit de PCR en temps réel Epi *pro*Colon (M5-01-002). Pour de plus amples informations, veuillez lire le mode d'emploi du kit de PCR en temps réel Epi *pro*Colon.

## 14. Références

1. De Vos, T. *et al.* Circulating methylated SEPT9 DNA in Plasma is a Biomarker for Colorectal Cancer, Clinical Chemistry 55:7, 1337-46(2009)
2. Lofton-Day, C. *et al.* DNA methylation biomarkers for blood-based colorectal cancer screening Clinical Chemistry 54:2, 414-423 (2008)
3. Gruetzmann, R. et al. Sensitive Detection of Colorectal Cancer in Peripheral Blood by Septin 9 DNA Methylation Assay. PLoS ONE, Volume 3, Issue 11, e3759 (2008)
4. Model, F. *et al.* Identification and validation of colorectal neoplasia-specific methylation markers for accurate classification of disease. Mol Cancer Res 5, 153-163 (2007)

## 15. Pour nous contacter

Le Kit de préparation pour extraction d'ADN de plasma Epi *pro*Colon est fabriqué par:

Epigenomics AG,
Kleine Präsidentenstrasse 1,
10178 Berlin, Allemagne

Avec l'utilisation des composants de:

Chemagen Biopolymer-Technologie AG
Arnold-Sommerfeld-Ring
52499 Baesweiler, Allemagne

Pour obtenir de plus amples informations et pour toute assistance, veuillez envoyer un courriel à:

support@products.epigenomics.com

ou appelez au numéro suivant: +49 30 243 45-222.